

PRODUCTION OF POLY-beta-HYDROXYBUTYRIC ACID

Patent Number: JP1027483
Publication date: 1989-01-30
Inventor(s): SHIMIZU SHOICHI; others: 02
Applicant(s): SHOICHI SHIMIZU; others: 01
Requested Patent: ☐ JP1027483
Application Number: JP19870183260 19870724
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P7/62
EC Classification:
Equivalents: JP1740601C, JP4025798B

Abstract

PURPOSE: To accumulate low-molecular weight poly-beta-hydroxybutyric acid, by using a microbial strain capable of assimilating methanol and accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid in the microbial cell and culturing the strain in a medium containing methanol, ammonia, etc.

CONSTITUTION: A microbial strain capable of assimilating methanol and accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid in the microbial cell is cultured and proliferated in a medium at least containing methanol as a carbon source and ammonia and/or ammonium salt as a nitrogen source. The cultured cells are further cultured while controlling the methanol concentration in the culture liquid within 5-50g per 1l of the culture liquid to effect the production and accumulation of a low-molecular weight poly-beta-hydroxybutyric acid in the microbial cell and produce the objective poly-beta-hydroxybutyric acid. The culture temperature is preferably 29-31 deg.C and the dissolved oxygen concentration in the culture liquid is preferably controlled to about 1-7ppm.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-27483

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)1月30日

C 12 P 7/62
// (C 12 P 7/62
C 12 R 1:01)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造方法

⑯ 特 願 昭62-183260

⑰ 出 願 昭62(1987)7月24日

| | | | |
|---------|-----------|-----|--|
| ⑱ 発 明 者 | 清 水 | 祥 一 | 愛知県名古屋市中東区上社2丁目37番地 シーアイマンシ ョン本郷312 |
| ⑲ 発 明 者 | 山 根 | 恒 夫 | 愛知県名古屋市中千種区北千種1-9-7 仲田住宅11-16 |
| ⑲ 発 明 者 | 鈴 木 | 高 広 | 愛知県名古屋市中昭和区西畑町61番地 6 |
| ⑰ 出 願 人 | 清 水 | 祥 一 | 愛知県名古屋市中東区上社2丁目37番地 シーアイマンシ ョン本郷312 |
| ⑰ 出 願 人 | 山 根 | 恒 夫 | 愛知県名古屋市中千種区北千種1-9-7 仲田住宅11-16 |
| ⑰ 代 理 人 | 弁理士 小堀 貞文 | | |

明 細 書

1. 発明の名称

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

メタノール還元性とポリ-β-ヒドロキシ酪酸の固体内蓄積能とを有する菌を、炭素源としてのメタノールおよび窒素源としてのアンモニアおよび/またはアンモニウム塩を少なくとも含有する培地で培養して主として該菌の固体内を増殖させる第一工程と、次いで、この菌を、栄養を制限した条件下で培養して、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸を固体内に生成蓄積させる第二工程との2工程で培養してポリ-β-ヒドロキシ酪酸を製造する方法において、第二工程における培養液中のメタノール濃度を培養液1ℓあたり5gを越え50g以下に制御して培養し、低分子量のポリ-β-ヒドロキシ酪酸を該固体内に生成蓄積させることを特徴とするポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、微生物を用いるポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造方法に関し、さらに詳細には、低分子量のポリ-β-ヒドロキシ酪酸を高濃度で含有する固体内を得ることによるポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造方法に係わる。

(従来の技術、発明が解決しようとする問題点)

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸(以下 PHB と記すこともある)は、微生物が作るバイオポリマーの1種であり、種々の細菌が細胞内に炭素源或いはエネルギー源として蓄積する貯蔵物質であり、生物が分解可能な熱可塑性樹脂として、医薬類や農薬類の配合剤や医療材料などの多方面での応用が期待されている。

本発明者らは、先に、比較的安価な炭素源としてメタノールを用いプロトモナス属に属する菌によるPHBの製造について研究開発した(特開昭62-55094)が、ここで得られるPHBの平均分子量は 30×10^4 程度で比較的高かった。

一方、医薬、農薬などの活性物質の検出システムとしてマイクロカプセル化もしくはマイクロスフェア化のためには、従来に比べ、より低分子量のPHBの出現が望まれていたが、このようなより低分子量のPHBは出現していない。

本発明者らは、従来に比べ、より低分子量のPHBの微生物的製造法を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、メタノール還元性と菌体内PHB蓄積能とを有する微生物を培養して菌体濃度を高める第一工程の後、栄養を制限した条件下で、メタノールの存在下で培養して菌体内にPHBを生成蓄積させる第二工程を経る培養法において、少なくとも、第二工程における培養液中のメタノール濃度を特定の濃度に制御することにより、低分子量のPHBを菌体内に高濃度に含有する菌体を製造し得ることを見出し、本発明に到達した。

すなわち、本発明は、メタノール還元性とポリ-β-ヒドロキシ酪酸の菌体内蓄積能とを有する菌を、炭素源としてのメタノールおよび窒素源としてのアンモニアおよび／またはアンモニウム塩

を少なくとも含有する培地で培養して主として該菌の菌体を増殖させる第一工程と、次いで、この菌を、栄養を制限した条件下で培養して、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸を菌体内に生成蓄積させる第二工程との2工程で培養してポリ-β-ヒドロキシ酪酸を製造する方法において、第二工程における培養液中のメタノール濃度を培養液1ℓあたり5gを越え50g以下に制御して培養し、低分子量のポリ-β-ヒドロキシ酪酸を該菌体内に生成蓄積させることを特徴とするポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造方法である。

本発明で使用される菌は、メタノール還元性とPHBの菌体内蓄積能とを有する菌であれば特に制限はないが、実用上、プロトモナス属に属する細菌が好ましい。

このプロトモナス属に属する細菌は、インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムティック・バクテリオロジー 第34巻 第2号 第188～201頁(1984年4月)(著者 浦上氏および駒形氏)によれば、極鞭毛を有し、グラム陰性、非

孢子形成性があり、単独または対で存在する桿菌である。細胞中にカロテノイド色素およびバクテリオクロフィルが形成される。デオキシリボ核酸の塩基組成は、グアニンおよびシトシンの含有率がそれぞれ65乃至67モル%である。菌体内脂肪酸は、大量のC_{16:1}(炭素数18個および二重結合1個を有していることを示す。以下同様)直鎖不飽和脂肪酸および少量のC_{16:1}直鎖不飽和脂肪酸、C_{16:1}シクロプロパン酸ならびに3-OH-C_{16:1}、β-ヒドロキシ酸から成る。主なユビキノンはQ-10であり、ユビキノンQ-8、Q-9およびQ-11が少量成分として含有されている。

しかして、プロトモナス属には、従来のシェードモナス属に属する或る種の菌株も含まれている。

本発明において好適に使用される菌株は、プロトモナス・エクストルクエンシスK(Protonotus extorquens K, 微生物研究第8395号)であり、その菌学的性質は特開昭62-55094号公報に詳細に記載されている。

本発明において、菌は、主として菌体を増殖さ

せることを目的とする第一工程と、主としてPHBを菌体内に生成蓄積させることを目的とする第二工程との2工程の培養を経て得られる。

本発明の第一工程では、菌を、対数増殖期乃至定常期、好ましくは対数増殖期、たとえば、菌体濃度として30乃至200g/ℓ培養液(以下で、「1ℓ」のℓは、特に断らない限りは「培養液1ℓ」を意味する)程度となるまで、少なくとも、炭素源としてのメタノールおよび窒素源としてのアンモニアを含有した培地を使用して培養する。

栄養源としては、炭素源であるメタノールおよび窒素源であるアンモニアおよび／またはアンモニウム塩のほかに、りん酸塩、カリウム塩、ナトリウム塩、硫酸塩、さらには、マグネシウム、鉄、カルシウム、亜鉛、マンガン、コバルト、銅およびモリブデンなどのそれぞれの金属塩が挙げられる。

なお、使用する菌が還元し得る炭素化合物またはその含有物を炭素源としてメタノールと併用することを妨げない。

炭素源としてのメタノール濃度は、使用した菌が生育増殖しうる濃度であればよく特に制限はないが、実用上、1～50 g/l程度とされる。さらに、低分子量のPHBを効率よく製造するためには、5 g/lを超え50 g/l以下が好ましく、5 g/lを超え40 g/l以下が特に好ましい。

培養液への栄養の添加は、培地または培養初期における培養液中に必要な量を一挙に添加してもよく、また、培養初期での培養液中の栄養の濃度を比較的低く設定し、培養期間中に菌によって消費された栄養の量に相当する量の栄養を連続的または間歇的に添加して培養液中の栄養の濃度を所定の濃度に維持する、いわゆる、流加によってもよい。必要量が多く、しかも、高い濃度では菌の生育増殖を阻害するような栄養—たとえば、メタノールならびにアンモニアおよびアンモニウム塩—は流加によって添加することが好ましい。

流加による栄養の添加は、たとえば、つぎのように行なわれる。

すなわち、メタノールについては、培養液中の

メタノール濃度をセンサーなどで検出し、検出されたメタノール濃度に対応してメタノールを流加する。たとえば、微孔性テフロン（商品名）チュービングセンサーとガスクロマトグラフとを使用し、これらと連結されたマイクロコンピュータを装備したプロセスコントローラーによることもできる。

アンモニアについては、pH調節計からの検出信号により、培養液のpH調節を兼ねてアンモニア水を添加することにより行われる。

培養液のpH、培養温度および培養液中の溶存酸素濃度などの培養条件は使用する菌によって異なり、一概に特定できないが、通常は、培養液のpHは、5～9であり、菌を活発に生育増殖させるためには、6～7.5が好ましく、中性が特に好ましく、また、培養温度は、25～37℃、菌を活発に生育増殖させるためには、29～31℃が好ましく、約30℃が特に好ましく、また、培養液中の溶存酸素濃度は1～7ppmに制御することが好ましい。

培養液中の溶存酸素濃度を制御するためには、

ムなどによって調節される。

このようにして得られた菌体内にはPHBは顆粒として蓄積される。このPHBは次の如くして分離回収される。すなわち、培養液から濾過および遠心分離などの固液分離手段により分離して得られた菌体から、または、さらに所望により超音波処理などで破壊された菌体から、たとえば、クロロホルムおよび1,2-ジクロロエタンなどのハロゲン化炭化水素を抽剤として抽出して得られたPHB抽出液から、これと貧溶媒とを混合するなどにより凝固沈殿させるなどのそれ自体公知の手段で処理して、PHBを分離する。必要に応じてさらに精製して高純度のPHBを得ることができる。

〔実施例〕

本発明を次の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例においては、各種の測定および分析は次の方法によった。すなわち、

(1) 菌体濃度の測定方法

たとえば、酸素または空気のような酸素含有ガスを培養液中に供給する。

培養は、回分、半連続および連続のいずれによることもできる。

本発明の第二工程での培養は、栄養を制限し、培養液中のメタノール濃度を5 g/lを超え50 g/l以下、好ましくは5 g/lを超え40 g/l以下に制御する以外は、第一工程における培養と実質的に異なる処はない。

制限される栄養としては、アンモニア、アンモニウム塩、りん酸塩および／またはマグネシウム塩などであるが、アンモニア、アンモニウム塩が好ましい。培地または培養液にアンモニアもしくはアンモニウム塩を全く含有させないか、または、炭素／窒素の量比が第一工程におけるよりも大きくなるようにアンモニアもしくはアンモニウム塩の量を調節することもできる。

アンモニアをこのようにして制限する場合には、培養液のpHはアンモニア以外のアルカリ性物質—たとえば、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウ

菌体濃度の測定は、培養液を 0.9wt% NaCl 水溶液で適度に希釈した後、570nm にて濁度を「島津スペクトロニック 20」で測定した。

プロトモナス・エクストルクエンス K について、濁度 (OD₅₇₀) と菌体濃度 (X) との関係は、

$$X (\text{g/l}) = \text{OD}_{570} \times 0.49$$

で示される。

(2) PHB の定量方法

細胞内の PHB の定量方法は、G. Brauneis らの方法に従って、ガスクロマトグラフにて分析を行った。操作方法は、凍結乾燥菌体約 20~50mg を秤取し、これをスクリーキャップ付 10ml 試験管に入れ、クロロホルム 2ml と、内部標準試薬の安息香酸を 1mg/ml 含む 3wt% 硝酸-メタノール溶液 2ml を加え、栓をして 110℃ で 3.5 時間反応させた。反応終了後、水 1ml を加えて激しく 10 分間振盪した後に、2 層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、このクロロホルム層をクロマトグラフィーにかけて、安息香酸メチルのピークの面積とヒドロキシ酪酸メチルのピークの面積との比

から PHB の量を計算して求めた。

カラムは 2m ステンレスカラム (内径 3mm) を用いて、充填剤として Reoplex 400-Chromosorb GAW-DHCS 60/80 メッシュを使用した。

分析に先立ち、検量線を求めるために、菌体を含まない安息香酸のみを反応させたクロロホルム-メタノール混液にヒドロキシ酪酸メチルの特級試薬を秤取し、これを溶解させ、水 1ml を加えて激しく 10 分間振盪したのちに、2 層に分離した下層のクロロホルム層を分析に用いた。

その結果から、ピークの面積比と濃度との関係は次のように表すことができる。

すなわち、

$$C_s = 5.6 \times \frac{S_s}{S_a} \times C_a$$

C_s : ヒドロキシ酪酸メチルの濃度 (mg/ml)

C_a : 安息香酸メチルの濃度 (mg/ml)

S_s : ヒドロキシ酪酸メチルのピークの面積

S_a : 安息香酸メチルのピークの面積

検量線として、PHB の標品について同様な定

量操作を行なった場合にも、前記の式に合致する。なお、PHB の標品は、G. Brauneis らの方法に従って、プロトモナス・エクストルクエンス K のアセトン乾燥菌体からクロロホルムで抽出した後、残渣を濾過して除き、濾液をアセトン中に滴下して PHB を沈殿させ、得られた PHB をアセトンとジエチルエーテルでそれぞれ 2 回ずつ洗浄して得られたものである。

(3) PHB の分子量の測定

1g の凍結乾燥菌体に対してクロロホルム 20ml を使用し、12 時間、80℃ で抽出して得られた抽出液を濾過し、濾液に 3 倍容のヘキサンを加えて、PHB を沈殿させた。この PHB の沈殿をアセトンおよびジエチルエーテル各 50ml で、2 回ずつ洗浄して PHB を得た。

この PHB を、ゲル濾過カラムを用いた高速液体クロマトグラフ (以下 HPLC と記す) にかけて、PHB のピークの保持時間から、分子量既知の各種のポリスチレンを標準物質として予め作成された検量線を用い、その分子量を求めた。

なお、この PHB は、その 10mg にクロロホルム 2ml を加えて完全に溶解させた溶液を、フィルター (0.2μm) で濾過したのち、HPLC にかけた。

HPLC の条件は次の通りであった。

カラム : TSK gel GMH (東洋曹達工業製)

ガードカラム : TSK guard column (東洋曹達工業製)

溶出液 : クロロホルム

溶出液速度 : 1.2 ml/min.

標準サンプル : 各種分子量のポリスチレンの 0.5% (W/V) クロロホルム溶液

検出器 : 示差屈折計

温度 : 室温

実施例 1

(1) 使用菌株

プロトモナス・エクストルクエンス K (微工研菌寄第 8395 号) を用いた。

(2) 使用培地および培養方法

第 1 表に示す培地 (以下 培地 A と記す) を使用して、前培養した。

第1表 培地Aの組成

| 成分 | 濃度 /l |
|--|--------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2.0 g |
| KH_2PO_4 | 1.6 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 6.0 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2.0 g |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 g |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 10 mg |
| $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ | 4 mg |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10 mg |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.4 mg |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2 mg |

すなわち、500ml容坂口フラスコ6本に、培地A 100mlを充填し、炭素源として1%(W/V)となるようにメタノールを無菌的に加え、これに、保存用スラントからの一白金耳の菌体を接種した後、30℃で3日間振盪培養した。菌体が増殖した後、滅菌済みの栓付遠心管を用いて、雑菌で汚染され

された。溶存酸素濃度は、フィールドラブ溶存酸素分析計(Beckman Co.)を用いて測定した。

前記の条件下で菌体を増殖させ、対数増殖期間内にある培養液の菌体濃度が約50g/lに達したときに、添加アンモニア水を10wt%水酸化カリウムに切り換え、pHを7.0に維持したまま、第二工程に移行した。なお、メタノール濃度は第二工程でも第一工程に引き続いて40g/lとなるように制御した。その他の条件は、第一工程におけると同様にした。

第一工程の培養開始から72時間経過後、菌体のPHB含有率は35wt%となり、また、このPHBの平均分子量は 3.5×10^4 と著しく低かった。

実施例2

培養開始時の培養液中のメタノール濃度を10g/lとし、培養期間中の培養液中のメタノール濃度も10g/lを維持するように制御した他は実施例1と同様に行なった。

第一工程の培養開始から88時間経過後、菌体のPHB含有率は47wt%となり、また、このPHB

ないようにして遠心分離した。

このようにして前培養で得られた菌体を新鮮な培地A 100mlに再懸濁し、ジャーファーメンター(2ℓ容 Iwashita Co. Type MB)に、予め充填しておいたメタノール40mlが添加された700mlの培地Aと合わせ、800ml(メタノール濃度40g/l培地相当)として第一工程の培養を開始した。

培養温度、培養液のpHおよび培養液中のメタノール濃度をそれぞれ30℃、7.0および40g/lに定値制御して、培養を行なった。

メタノール濃度の制御は、所定値となるようにマイクロコンピューターを装備したプロセスコントローラーと連動させたポンプによりメタノールを供給して行なった。

pHの調節には、濃度33wt%のアンモニア水を用い、pH調節計にアルカリ(アンモニア水)供給ポンプを連動させて行なった。

培養液中の溶存酸素濃度は、空気と純酸素との混合気体を供給して2ppmに維持した。この溶存酸素濃度は第一工程のみならず第二工程でも維持

の平均分子量は 4.3×10^4 と低かった。

実施例3

培養開始時における培養液中のメタノール濃度を0.01~32g/lの範囲で種々の濃度とし、培養期間中の培養液中のメタノール濃度を、それぞれの所定の濃度が維持されるように制御して培養した他は、実施例1と同様に行なった。

すなわち、第一工程での培養液の菌体濃度が約50g/lに達したときに、第二工程に移行した。第一工程の培養開始から70~90時間経過後、PHB含有率の増加がほぼ認められなくなったときに、培養を終了し、このときのPHBの平均分子量を測定した。

その結果、培養液中のメタノール濃度が5g/lを越え32g/lまでは、PHBの平均分子量は、 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ と著しく低かった。

比較例1

培養開始時の培養液中のメタノール濃度を2g/lとし、培養期間中の培養液中のメタノール濃度も2g/lを維持するように制御し、かつ、培養液

のpHを6とした他は、実施例1と同様に行なった。

第一工程の培養開始から70時間経過後、菌体のPHB含有率は63wt%となったが、このPHBの平均分子量は 28×10^4 と高かった。

比較例2

メタノールの流下速度を約 $0.2 \text{ g/g-菌体} \cdot \text{hr}$ とし、単位菌体重量あたり一定とし、培養全期間をとおして培養液中のメタノール濃度をほぼ 0.01 g/l に維持した他は、実施例1と同様に行なった。

第一工程の培養開始から91時間経過後、菌体のPHB含有率は67wt%となったが、このPHBの平均分子量は 55×10^4 と著しく高かった。

(発明の効果)

本発明によれば、たとえば、プロトモナス属に属する菌のようなメタノール酸化性とポリ-β-ヒドロキシ酪酸の菌体内蓄積能とを有する菌を使用して、利用価値の高い低分子量のPHBを効率よく製造することができる。